

# シアノトキシンに関する情報提供

京都大学大学院 工学研究科  
浅田安廣

# WHO飲料水水質ガイドライン第4版の更新

令和4年3月、更新されたWHO 飲料水水質ガイドライン第4版(第1及び第2補遺を含む)を公表



## シアノトキシンに関連する変更点

Microcystin-LR → Total Microcystins\* に変更

\* Totalとは、多様なMicrocystinを全て合わせたという意味

Cyanobacterial toxinsとしてanatoxin-a variants、Cylindrospermopsins、Saxitoxinsのガイドライン値の追加

Cyanobacterial toxinsに対して短期ガイドライン値を設定

# シアノトキシン（ガイドライン値）

参照: Guidelines for drinking-water quality: Fourth edition  
incorporating the first and second addenda

	MCs	CYNs	ATXs	STXs
	(μg/L)			
AL1 (長期曝露 を想定)	1 (lifetime pGV)	0.7 (lifetime pGV)	3 (1/10 of AL2)	0.3 (1/10 of AL2)
AL2 (短期曝露 を想定)	12 (short-term pGV)	3 (short-term pGV)	30 (short-term provisional reference)	3 (acute GV)

# 話題提供

1. シアノトキシンの分析について

2. シアノトキシンの安定性について

# シアノトキシン分析方法

	EPA			EU			
MC	○			○			
CYN		○			○		
ATX-a			○			○	
STX							○
前処理	溶媒抽出-SPE	凍結再融解	凍結再融解	溶媒抽出-SPE	溶媒抽出-SPE	溶媒抽出-SPE	溶媒抽出-SPE
内部標準物質	C <sub>2</sub> D <sub>5</sub> -MC-LR	Uracil-d <sub>4</sub>	L-Phe-ds			L-Phe-ds	
分析法	LC-MS/MS,	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS
カラム	C8	T3	T3	C18	C18	C18	C18 Ion pair

参照: EPA544 EPA545 EPA545  
 C8: Phenomenex, An LC C8 column  
 T3: Waters Xselect HSS T3

Handbook of Cyanobacterial Monitoring  
 And Cyanotoxin Analysis 2017

# シアノキシン分析方法

	ISO	NIES	NIES
MC	○	○	○
CYN	X	○	○
ATX-a	X	○	○
STX	X	X	○
前処理	凍結再融解	凍結再融解	凍結再融解
内部標準物質	15N	15N, 13C	15N, 13C
分析法	LC-MS/MS,	LC-MS/MS	LC-MS/MS
カラム	C18	ADME	HILIC

ISO22104

# シアノトキシン分析方法

ポイント: ガイドライン値の対象がMC-LRからTotal MCsに変更

Total MCsの測定: MCsの共通骨格Addaに着目した測定方法を構築

US EPA Method 546: ELISA法による測定

田中ら、2013: LC-MS/MS によるTotal MCsの迅速分析法  
(Adda残基の2-Methyl-3-methoxy-4-phenylbutyric acid(MMPB))

個別物質の測定(LC-MS/MS)

US EPA Method 544: MC-LA, MC-LF, MC-LR, MC-LY, MC-RR, MC-YR

Matsuki *et al.*, 2022 : MC-LR, MC-YR, MC-RR  
(CYN, ATXも同時測定可能)

# シアノキシン分析の試み@国立環境研究所

実試料 (凍結保存): 1mL使用



融解: 超音波 (室温、10分間)



5%となるように酢酸を添加  
サロゲート物質を添加



凍結融解を2回実施

凍結:  $-20^{\circ}\text{C}$ で1時間程度

融解: 超音波 (室温、10分間)



フィルターろ過



LC-MS/MSで一斉分析  
(今回は、MC、CYL、ATN)

サンプル

湖沼: 2本

浄水: 1本

(チオ硫酸ナトリウム添加)



サロゲート物質は検出

MC、CYL、ATNは今回は非検出

別途調製したアオコ試料からは  
MC、CYLが検出



# シアトキシン分析の試み@国立保健医療科学院

LC-MS/MSで一斉分析を実施：MC3種、CYL2種、ATX1種

使用機器：3200 QTRAP LC-MS/MS System (Sciex)

	定量下限値	ガイドライン値
Microcystis-LR	0.1 µg/L	1 µg/L
Microcystis-RR	0.1 µg/L	1 µg/L
Microcystis-YR	0.1 µg/L	1 µg/L
Cylindrospermopsin	0.1 µg/L	0.7 µg/L
7-Deoxy-Cylindrospermopsin	0.1 µg/L	0.7 µg/L
Anatoxin	0.1 µg/L	3 µg/L

# シアノキシン分析の試み@国立保健医療科学院

## 測定に用いた試料

浄水場原水試料 19試料(2022年10月採水)

湖沼アオコ試料 1試料(2023年8月採水)

河川付着物試料 1試料(2023年7月採取)

単離株 24株(下記に詳細)

NIES関係 7株

(*Microcystis*属, *Aphanizomenon*属, *Raphidopsis*属)

科学院保有株 17株

(*Dolichospermum*属, *Aphanizomenon*属, *Microcoleus*属)

# シアノキシン分析の試み@国立保健医療科学院

## 測定結果

浄水場原水試料 19試料中1試料からMC-RRが検出  
湖沼アオコ試料 不検出  
河川付着物試料 不検出  
単離株 24株

NIES関係 7株(全て検出)

*Microcystis aeruginosa*(4株): MC-RR(4), MC-LR(3), MC-YR(1)

*Aphanizomenon* sp.(2株): Anatoxin(2)

*Raphidopsis raciborskii*(1株): 7-Deoxy-Cylindrospermopsin(1),  
Cylindrospermopsin(1)

科学院保有株 17株(検出なし)

## ポイント: サロゲート物質の重要性

安定同位体が含有しているサロゲート物質により、各シアノキシンのピーク位置を正確に把握可能→今回の試料で非常に近い位置でピークが確認されたが、測定対象の物質ではないことが判明(サロゲート物質が有用)

# 話題提供

1. シアノトキシンの分析について

2. シアノトキシンの安定性について

# シアノトキシンの安定性

## Microcystin (MC)

- ・比較的存在量が高いもの: MC-LA, MC-LR, MC-LF, MC-LY, MC-RR, MC-HtyR, MC-YR, MC-WR
- ・非常に安定性が高い化学物質  
(室温で保存しても何年も維持)
- ・太陽光に対してゆっくりとした光化学分解と異性化しか起こさない  
→フィコビリタンパク質が存在すると、反応速度が向上する  
(90%以上分解するのに最短で2週間、最長で6週間)

# シアノトキシンの安定性

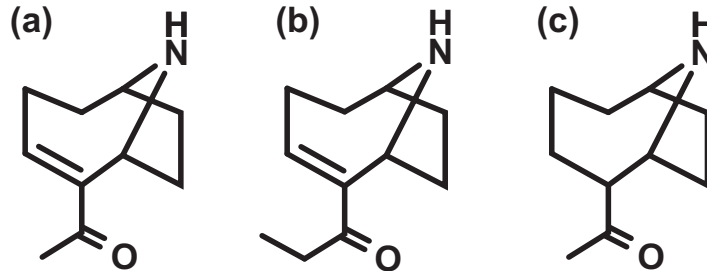
## Cylindrospermopsin (CYN)

化合物名	組成式	平均分子量(g/mol)
Cylindrospermopsin	$C_{15}H_{21}N_5O_7S$	415.428
7-Epi-cylindrospermopsin	$C_{15}H_{21}N_5O_7S$	415.428
7-Deoxy-cylindrospermopsin	$C_{15}H_{21}N_5O_6S$	399.429
7-Deoxy-desulpho-cylindrospermopsin	$C_{15}H_{21}N_5O_3$	319.366
7-Deoxy-desulpho-12-acetylcylindrospermopsin	$C_{15}H_{23}N_5O_4$	361.404

- 安定性が高い化学物質  
(例: 50°C以上、アルカリ条件下でゆっくり分解)
- 明暗の両条件でも安定して存在  
(細胞色素が存在すると、90%以上分解するのに23日)

# シアノトキシンの安定性

## Anatoxin (ATX)



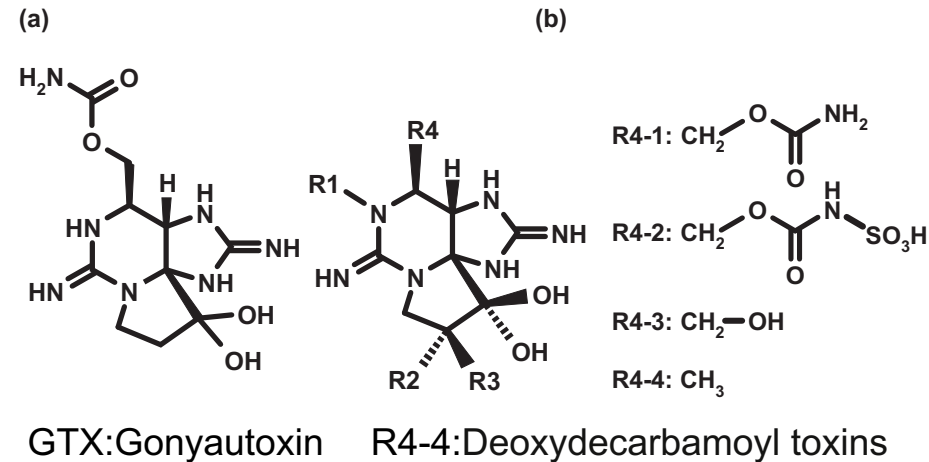
(a) anatoxin-a, (b) homoanatoxin, (c) dihydroanatoxin-a

- ・太陽光によって急速に分解  
→pH6以上では光分解により、半減期は1.6~11.5時間  
(暗所でpH9では、半減期は4-10日)
- ・pHが低いほど安定 (pH2~3では安定)

# シアノトキシンの安定性

## Saxitoxin (STX)

	R1	R2	R3	相対毒性
<b>Carbmate toxins(R4-1)</b>				
STX	H	H	H	1
neo STX	OH	H	H	0.93
GTX1	OH	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0.99
GTX2	H	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0.41
GTX3	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	0.90
GTX4	OH	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	0.73
<b>Sulphamate toxins(R4-2)</b>				
GTX5	H	H	H	0.15
GTX6	OH	H	H	0.07
C1	H	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0.01
C2	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	0.17
C3	OH	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0.01
C4	OH	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	0.06
<b>Decarbamoyl toxins(R4-3)</b>				
dcSTX	H	H	H	0.51
dcneoSTX	OH	H	H	n.a.
dcGTX1	OH	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	n.a.
dcGTX2	H	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0.65
dcGTX3	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	0.75
dcGTX4	OH	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	0.49



- ・暗所、室温でゆっくり加水分解する
- ・半減期は1~10週間で、90%以上分解には3ヶ月以上
- ・表層水中で、1~2ヶ月残留したケースあり



# シアノトキシンの酸化処理による 分解効果

非公表

# 塩素処理によるMicrocystinの 予想分解経路

- ・MC-LRは、塩素処理のみの場合、処理前後で細胞毒性に変化があまりない(CYNとSTXは塩素処理により毒性が減少)

非公表

# ご清聴ありがとうございました。

謝辞: 公表内容の一部は、厚生労働科学研究費補助金(健康安全・危機管理対策総合研究事業, 21LA1004) により行った。